	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10230.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu spektrofotometrickou metodou	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU $\beta$ -KAROTENU SPEKTROFOTOMETRICKOU METODOU

### 1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení  $\beta$ -karotenu v krmivech.  $\beta$ -karoten je přírodní barvivo chemicky patřící do skupiny tetraaterpenoidů a je provitaminem vitamínu A.

### 2 Princip

$\beta$ -karoten se stanoví po enzymatické hydrolýze směsi enzymů pepsin - trypsin v alkalickém prostředí, rozpuštění v acetonu a následné extrakci do hexanu, spektrofotometricky při vlnové délce 451 nm.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Pepsin, 0,7 FIP-U/mg, např. Merck, 1.07185.

2 Trypsin, 1645 U/mg, např. Fluka, 93615.

3 Amoniak,  $\text{NH}_3$ , koncentrovaný,  $\rho(\text{NH}_3) = 0,91 \text{ g/ml}$ .

4 Amoniak,  $\text{NH}_3$ , roztok  $c(\text{NH}_3) = 6 \text{ mol/l}$ .

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 230 ml amoniaku (3), doplní vodou (5) po značku a promíchá.

5 Voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

6 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ , koncentrovaná,  $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$ .

7 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ ,  $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 256 ml kyseliny chlorovodíkové (6), doplní vodou (5) po značku a promíchá.

8 Aceton.

9 n-Hexan.


10 Síran sodný, bezvodý.

11 Oxid hlinitý, aktivita I.

Příprava: 100 g oxidu hlinitého se deaktivuje smísením se 12 ml vody (5) 2 h před použitím.

12 Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl, dihydrát (EDTA).

13 Kyselina askorbová,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>  10230.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu spektrofotometrickou metodou	Vydání	1
		Revize	1

## Poznámky

1 *n-Hexan a aceton jsou nebezpečné hořlaviny I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.*

## 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 380 až 540 nm a kyveta o optické délce 10 mm.
- 2 Chromatografická kolona skleněná.
- 3 Kelímek filtrační skleněný s filtrační vložkou o porozitě S<sub>3</sub>.
- 4 Dělicí nálevka na 250 ml.
- 5 Vodní lázeň.


## 5 Pracovní postup

Do 50ml vysoké kádinky se naváží 1,0 g až 5,0 g vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se dvojnásobné množství vody (5) a na každé 2 g vzorku 400 mg pepsinu (1) a 400 mg trypsinu (2), 100 mg kyseliny askorbové (13), 100 mg EDTA (12) a 5 ml až 10 ml roztoku amoniaku (4). Směs se promíchá tyčinkou a opláchně se vodou. Kádinka se ponoří do vodní lázně (5) vytemperované na 50 °C a zahřívá se 30 min. Poté se kádinka se vytemperuje na laboratorní teplotu, přidá se míchadlo a pH se upraví pomocí pH-metru a roztoku kyseliny chlorovodíkové (7) na hodnotu pH 3 - na 1 ml amoniaku se přidá asi 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (7). Obsah kádinky se kvantitativně převede co nejmenším objemem vody na filtrační kelímek (3) a proplachuje se opatrně acetonem (8) za sníženého tlaku tak dlouho, až je filtrát bezbarvý. Obsah baňky se převede do dělicí nálevky (4), přidá se 25 ml hexanu (9) a třepe se asi 10 s.

Fáze se nechají rozdělit, poté se přidá asi 5 ml vody (5) a promíchá se krouživým pohybem bez roztřepávání. Tento krok s přidávkem vody (5) se opakuje ještě 2 ×. Vodná fáze se převede do druhé dělicí nálevky (4) a hexanový extrakt se převede do 50ml odměrné baňky přes vrstvu bezvodého síranu sodného (10). K vodné fázi se přidá 20 ml hexanu (9) a třepe se asi 10 s. Po rozdělení fází se vodná fáze odpustí do odpadu a hexanová fáze se spojí s prvním podílem v 50ml odměrné baňce přes vrstvu bezvodého síranu sodného (10), který se proplachuje hexanem (9) do 50ml odměrné baňky po značku.

Obsah odměrné baňky se promíchá a proměří se absorpční spektrum od 380 nm do 540 nm v kyvetě optické délky 1 cm. U získaného spektra o dvou maximech,  $\lambda_1 = 450$  nm a  $\lambda_2 = 477$  nm, se provede zkouška totožnosti - poměr absorbance  $\lambda_1/\lambda_2$  je v intervalu 1,16 ÷ 1,18.

V případě, že nevyhovuje zkouška totožnosti, musí se odstranit přítomné xanthophyly. Na chromatografickou kolonu (2) se nanese suspenze oxidu hlinitého (11) a hexanu (9) tak, aby výška sloupce oxidu hlinitého byla vysoká asi 5 cm a nechá se sedimentovat. Hexan (9) se odpustí právě ke sloupci oxidu hlinitého tak, aby nedošlo k jeho vyschnutí. Na chromatografickou kolonu se nanese 5 ml hexanového extraktu a  $\beta$ -karoten se eluuje

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>  10230.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu spektrofotometrickou metodou	Vydání	1
		Revize	1

do 25ml odměrné baňky hexanem (9) po značku. Obsah odměrné baňky se promíchá a opět se proměří absorpční spektrum od 380 nm do 540 nm v kyvetě optické délky 1 cm. U získaného spektra o dvou maximech,  $\lambda_1 = 450$  nm a  $\lambda_2 = 477$  nm, se provede zkouška totožnosti - poměr absorbance  $\lambda_1/\lambda_2$  je v intervalu  $1,16 \div 1,18$ .

## 6 Výpočet

Obsah  $\beta$ -karotenu X v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{3,86 \times A_{450} \times V \times R}{m}$$

kde

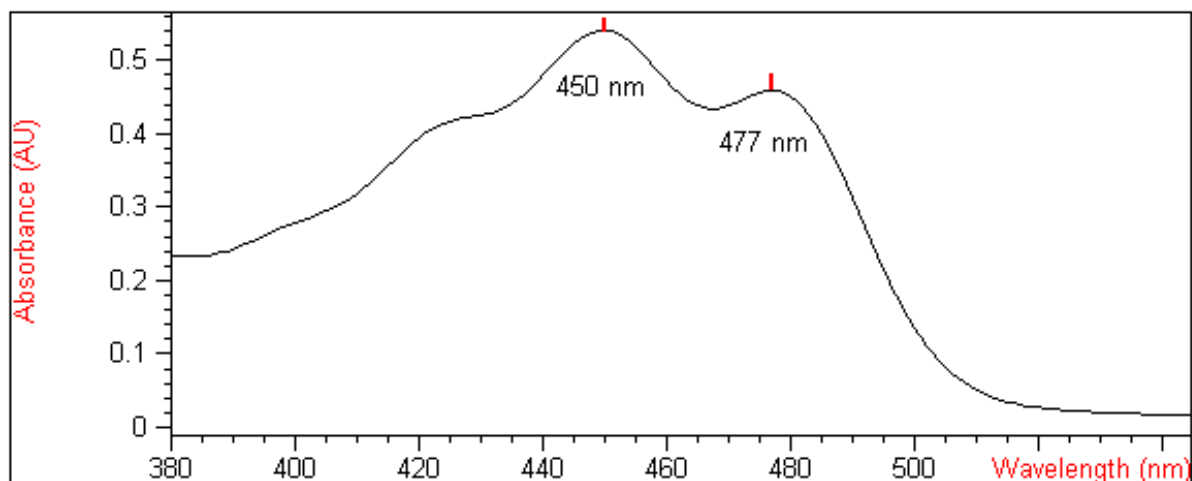
$A_{450}$  je absorbance extraktu při vlnové délce 450 nm v kyvetě optické délky 1 cm,

V objem hexanu extraktu v ml,

R ředění,

m hmotnost zkušební vzorku v g,

3,86 absorbanční koeficient  $\beta$ -karotenu  $A_{1cm}^{1\%}$  [450 nm, hexan] = 2592.



Obrázek 1. Absorbční křivka  $\beta$ -karotenu.